

КАРЕЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

Н. С. Репкина, В. В. Таланова, Л. В. Топчиева

**УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ
К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ
И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ**

Учебно-методическое пособие

Петрозаводск
2013

УДК [581.5:504.5+575.113] (075)

ББК 28.5

P41

Рецензенты:

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук,
профессор А.Ф. Титов
кандидат биологических наук О.Н. Лебедева

P41 Репкина Н.С., Таланова В.В., Топчиева Л.В.. **Устойчивость растений к действию тяжелых металлов и экспрессия генов: Учебно-методическое пособие.** Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. 32 с.

ISBN 978-5-9274-0594-7

В учебно-методическом пособии приведены современные данные об экспрессии разных групп генов, продукты которых (транскрипционные факторы, белки-транспортёры, металлотионеины, ферменты синтеза фитохелатинов, ферменты метаболизма глутатиона и т. д.) участвуют в ответных реакциях растений на действие тяжелых металлов. Описаны основные современные методы исследования экспрессии генов у растений. Даны некоторые методические рекомендации по проведению экспериментов, направленных на изучение влияния тяжелых металлов на экспрессию генов растений.

Предназначено для студентов вузов биологических, экологических и биохимических специальностей.

*Книга издана за счет средств гранта Министерства образования
и науки Российской Федерации, соглашение № 14.132.21.1321*

ISBN 978-5-9274-0594-7

© Карельский научный центр РАН, 2013

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие разработано для использования при подготовке к занятиям по курсу «Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам», предназначенному для студентов вузов биологических, экологических и биохимических специальностей. В ходе изучения данного курса студенты рассматривают влияние тяжелых металлов на основные физиологические процессы растений и знакомятся с механизмами металлоустойчивости, действующими на разных уровнях организации (организменном, тканевом, клеточном и молекулярном). Настоящее учебно-методическое пособие содержит краткую информацию о поступлении тяжелых металлов в растения, а также их влиянии на физиолого-биологические процессы и экспрессию разных групп генов. Кроме того, в данном пособии описаны современные методы, которые широко используются в молекулярной биологии и позволяют исследовать экспрессию разных групп генов или генома в целом у растений при действии тяжелых металлов.

ГЛАВА 1

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЯ

В настоящее время в связи с развитием промышленности и увеличением техногенной нагрузки на биосферу, проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами весьма актуальна. К тяжелым металлам относят химические элементы, имеющие плотность более 5 г/см^3 и атомную массу свыше 50 Да. Они поступают в окружающую среду прежде всего из техногенных (разные виды промышленности, автотранспорт, сжигание топлива и др.) и в меньшей степени из природных (извержения вулканов, ветровая эрозия почв и горных пород, космическая пыль и др.) источников.

Многие химические элементы, относящиеся к тяжелым металлам, необходимы в небольших концентрациях для нормальной жизнедеятельности растений и становятся токсичными только при значительном повышении их содержания. К ним, например, относятся Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni. В то же время некоторые тяжелые металлы, такие как Pb, Cd и Hg, не участвуют в метаболизме растений и являются токсичными для них даже в очень низких концентрациях.

Основными источниками поступления тяжелых металлов в растения являются почва и воздух. Механизм поступления металлов в растения через корневую систему из почвы состоит из пассивного (неметаболического) переноса ионов в клетку в соответствии с градиентом их концентрации и активного (метаболического) процесса поглощения клеткой против градиента концентрации. Поглощение тяжелых металлов из воздуха надземной частью растений включает неметаболическое проникновение через кутикулу и метаболический перенос ионов через плазматические мембраны и протопласт клеток.

Известно, что воздействие тяжелых металлов оказывает негативное влияние на многие физиологические и биохимические процессы у растений. За счет высокого сродства к сульфгидрильным группам клеточных белков тяжелые металлы встраиваются в их

молекулы, что приводит к снижению активности ферментов, замедлению процессов клеточного деления и изменению структуры и проницаемости мембран. Наряду с этим происходит резкое изменение экспрессии многих генов и последующего синтеза их продуктов. В результате всего этого под влиянием тяжелых металлов ингибируются процессы фотосинтеза, изменяется интенсивность дыхания, нарушается водный обмен, минеральное питание. Изменение основных физиологических процессов приводит в конечном счете к торможению роста и снижению продуктивности растений.

Вместе с тем, растения обладают достаточно широким спектром адаптивных механизмов, сформировавшихся в процессе длительной эволюции и действующих на разных уровнях организации – от молекулярного до организменного, которые способствуют поддержанию их клеточного гомеостаза и повышению металлоустойчивости, что позволяет растениям адаптироваться и выживать в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Известно, что в основе многих механизмов устойчивости растений к тяжелым металлам, так же как и устойчивости к другим стресс-факторам, лежит индуцированный синтез белков, связанный с экспрессией определенных генов (или групп генов).

ГЛАВА 2

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ

2.1. Экспрессия генов транскрипционных факторов

Транскрипционные факторы – это белки, контролирующие процесс синтеза мРНК на матрице ДНК путем связывания со специфическими участками ДНК. Характерная особенность факторов транскрипции – наличие в их составе одного или более ДНК-связывающих доменов, которые, в свою очередь, связываются со специфическими участками ДНК, расположенными в регуляторных областях генов. Благодаря этому они играют важную роль в регуляции экспрессии генов. В настоящее время выделено и описано несколько сотен транскрипционных факторов у разных видов растений.

Основываясь на структуре ДНК-связывающего домена(-ов) в структуре транскрипционных факторов, их выделяют в отдельные семейства, такие как AP2/EREF (APETALA2/ethylene-responsive-element binding factor), MYB (MYeloBlastosis protein), bHLH (basic helix-loop-helix), bZIP (basic leucine zipper proteins), WRKY и др.

Семейство AP2/EREF. В последние годы появляются сведения о роли транскрипционных факторов в регуляции транскрипции генов, индуцируемых действием тяжелых металлов. Например, в экспериментах с проростками пшеницы наблюдали достаточно быстрое увеличение содержания транскриптов генов *DREB1* (DRE (dehydration-responsive element)-binding transcription factor) и *CBF1* (CRT (C-repeat)- binding transcription factor) в листьях при действии кадмия, которое сохранялось на повышенном уровне длительное время. Кроме того, активацию генов *OsDREB1A* и *OsDREB1B* транскрипционных факторов под влиянием кадмия отмечали в корнях риса. В отличие от этого, у растений кермека (*Limonium bicolor*) действие кадмия и меди в высоких концентрациях приводило к снижению содержания транскриптов гена *LbDREB* в листьях и корнях.

Семейство MYB. Установлено, что кадмий и цинк повышают экспрессию генов *MYB4*, *MYB10*, *MYB72* у растений арабидопсиса

(*Arabidopsis thaliana* L.). Кроме того, кадмий способствовал значительному повышению экспрессии гена *MYB28* у растений ярутки (*Thlaspi caerulescens*) и усиливал экспрессию генов *MYB43*, *MYB48* и *MYB124* в корнях арабидопсиса, в то время как медь не вызывала активации их экспрессии.

Семейство bHLH. Показано, что под влиянием кадмия и цинка в корнях и листьях арабидопсиса происходит накопление транскриптов гена *bHLH100*, тогда как у растений ярутки повышение экспрессии данного гена наблюдалось только при действии кадмия.

Семейство WRKY. Установлено, что кадмий индуцировал у *T. caerulescens* экспрессию гена транскрипционного фактора *WRKY53*, кодирующего белок, относящийся к семейству транскрипционных факторов WRKY.

Семейство bZIP. Представителями еще одного семейства факторов транскрипции, экспрессия которых также активируется кадмием, являются *bZIP*. Отметим, что экспрессия генов факторов транскрипции bZIP повышается уже через несколько часов от начала воздействия кадмия в корнях, листьях и стебле трансгенных растений табака, инфицированных *Agrobacterium*, содержащей ген *ThbZIP1*, выделенный из галофита – древесного растения *Tamarix hispida*.

Как отмечалось выше, факторы транскрипции являются регуляторными белками и способны регулировать экспрессию структурных генов. Так, при действии тяжелых металлов происходит активация экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие как во внутриклеточном, так и в дальнем транспорте тяжелых металлов по растению. Наряду с этим активизируются процессы образования хелатных комплексов. В основе этих процессов также лежит активация экспрессии генов, продукты которых участвуют в детоксикации тяжелых металлов.

2.2. Экспрессия генов белков-транспортеров

В настоящее время выделены и охарактеризованы у разных видов растений множество генов, кодирующих белки-транспортеры, которые обеспечивают как ближний, так и дальний транспорт ионов металлов по растению. Среди основных семейств данных белков можно выделить: ZIP семейство (Zinc related transporter / Iron related transporter – like Protein), NRAMP (natural resistance

associated macrophage protein), CTR (The Copper Transporter Family), АТФаз Р1В –типа, АТФаз V-типа, ABC (ATP-binding cassette), FRD (Ferric Reductase Defective), OPT (The Oligopeptide Transporters Family) CDF (CATION DIFFUSION FACILITATOR).

Семейство ZIP. У *A. thaliana* выделено несколько генов, кодирующих ZIP транспортеры – *AtZIP1–AtZIP5*, *AtZIP9–AtZIP12* и *AtIRT3*. Установлено, что содержание транскриптов этих генов у арабидопсиса возрастает при недостатке Zn, тогда как у гипераккумуляторов *Arabidopsis halleri* и *T. caerulescens* экспрессия генов *ZIP4*, *ZIP10*, *IRT3* по мере поступления цинка в растения снижается. В корнях арабидопсиса и гороха при дефиците железа экспрессия гена *IRT1* и соответственно синтез транспортных белков IRT1 способствует поглощению катионов кадмия и цинка. У арабидопсиса экспрессия гена *AtIRT1* активируется при воздействии никеля, что говорит о возможном участии транспортера IRT1 в аккумуляции и транспорте этого металла.

Семейство NRAMP. Показано, что экспрессия гена *AtNRAMP1* у трансгенных растений арабидопсиса увеличивает устойчивость к высоким концентрациям железа. Данный ген кодирует белки, принадлежащие к семейству белков-транспортеров NRAMP. У *A. halleri* и *T. caerulescens* ген *NRAMP3* экспрессируется преимущественно в корнях, но у *A. halleri* экспрессия данного гена наблюдается и в побегах. Кроме того, в корнях ярутки экспрессировались гены *NRAMP1* и *NRAMP5*.

Представители CTR семейства белков-транспортеров впервые были обнаружены у дрожжей и млекопитающих, а затем и у растений. Показано, что у *A. thaliana* экспрессия гена *COPT1*, кодирующего белок COPT, локализованный на плазмалемме, играет ключевую роль в поглощении меди.

Белки-транспортеры семейства CDF имеют также второе название MTP (Metal Tolerance Protein). Представители данного семейства способны переносить ионы двухвалентных металлов таких как цинк, кадмий, кобальт, никель и марганец из цитозоля или в вакуоль через тонопласт, или из клетки через плазмалемму. Экспрессия гена *AhMTP1* у растений *A. halleri* повышалась в присутствии цинка преимущественно в листьях. Даже незначительное увеличение экспрессии гена *AhMTP1* у арабидопсиса способствовало возрастанию устойчивости растений к повышенным концентрациям цинка.

Семейство АТФаз P1B-типа. Белки-транспортеры АТФаз P1B-типа принадлежат к суперсемейству АТФаз P-типа. Представители данного семейства способны переносить катионы металлов через биологические мембраны из цитоплазмы в вакуоль или апопласт против электрохимического градиента за счет энергии гидролиза АТФ. АТФазы P1B-типа у ряда видов растений были переименованы в НМА (heavy-metal ATPases). Установлено, что при действии высоких концентраций цинка и кадмия повышается экспрессия гена *AtHMA4* у арабидопсиса и *T. caerulescens*, а также трех генов *HMA*s (*OsHMA5*, *OsHMA6*, *OsHMA9*) у риса. НМА белки отличаются большей селективностью, чем белки-транспортеры других классов. В частности, белки НМА2, НМА3 и НМА4 способны транспортировать только катионы цинка и кадмия.

Семейство АТФаз V-типа. Белки АТФаз V-типа способны обеспечивать работу $\text{Cd}^{2+} / \text{H}^{+}$ -антипортера. В недавних исследованиях было показано, что кадмий и медь способствуют активации экспрессии генов, кодирующих АТФазы V-типа в корнях растений ячменя и огурца. В частности, у проростков ячменя под влиянием кадмия наблюдалось усиление экспрессии генов двух субъединиц вакуолярной H^{+} -АТФазы *HvVHA c* и *HvVHA E*, что свидетельствует об их участии в механизмах металлоустойчивости.

Семейство ABC. Белки ABC-типа принимают участие в транспорте ионов металлов в форме хелатов в вакуоль через тонопласт. В данном семействе выделяют подсемейство MRP (multidrug resistance associated proteins), характерное для млекопитающих, однако гены, кодирующие MRP белки, обнаружены и у растений, в частности арабидопсиса и риса. Увеличение содержания транскриптов гена *AtPDR8*, кодирующего белок AtPDR8 ABC-типа, локализованный в плазмалемме арабидопсиса, происходило в присутствии кадмия и свинца, а трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *AtPDR8* и повышенной металлоустойчивостью не аккумулировали ионы этих металлов.

Семейство FRD. Белки-транспортеры FRD вовлечены в гомеостаз ионов железа. Показано, что экспрессия гена, кодирующего белок-транспортер FRD3, участвующий в загрузке ионов металлов в ксилему и их дальнейшем транспорте, возрастает в корнях гипераккумуляторов тяжелых металлов *A. halleri* и *T. caerulescens*. Кроме

того, отмечено, что уровень транскриптов гена *FRD3* также повышается в листьях *A. halleri* в отличие от *A. thaliana*. Отметим, что в большей степени белок *FRD3* участвует в гомеостазе железа и в его транспорте по ксилеме в присутствии цинка у гипераккумуляторов *A. halleri* и *T. caerulescens*, чем у *A. thaliana*, не накапливающего тяжелые металлы.

Суперсемейство OPT включает подсемейство YSL (Yellow Stripe-Like), характерное для растений. У арабидопсиса было выделено 8 YSL белков-транспортёров. Показано, что ген *AtYSL1* экспрессируется в листьях и пыльце, а ген *AtYSL2* – в тканях ксилемы и флоэмы побега и корня арабидопсиса.

В целом, белки-транспортёры играют важную роль в поглощении ионов металлов и их транспорте как внутри клетки, так и по растению. Наряду с необходимыми для нормальной жизнедеятельности металлами растения способны поглощать и ионы токсичных тяжелых металлов. В этом случае запускаются внутриклеточные механизмы детоксикации, к которым прежде всего относится хелатирование металлов (образование хелатных комплексов за счет связывания ионов металлов с различными лигандами).

2.3. Экспрессия генов металлотионеинов

Металлотионеины (MT) относятся к семейству низкомолекулярных металл-связывающих белков с высоким содержанием цистеина. Они обнаружены у животных, растений и грибов. На основании распределения цистеиновых остатков и количества ароматических аминокислот металлотионеины у растений подразделяются на 4 типа (MT 1–4).

Известно, что у животных металлотионеины участвуют в детоксикации таких металлов как свинец, кадмий, ртуть и метаболизме металлов, необходимых для физиологических процессов (медь и цинк), однако у растений их роль полностью не ясна.

Показано, что кадмий активирует транскрипцию гена *BgMT2* в листьях проростков *Bruguiera gymnorrhiza*. В то же время экспрессия гена *AmMT2* в листьях *Avicennia marina* под влиянием цинка, меди и свинца зависела от концентрации металла и продолжительности его действия: содержание транскриптов гена *AmMT2* увеличивалось при довольно высоких концентрациях металлов.

Как отмечалось выше, роль металлотионеинов в детоксикации тяжелых металлов все еще изучена недостаточно. Однако, имеются сведения о том, что экспрессия гена *MT2* рапса в трансгенных растениях арабидопсиса вызывала повышение их устойчивости к кадмию и меди.

2.4. Экспрессия генов фитохелатинсинтазы

Фитохелатины представляют собой небольшие богатые цистеином пептиды с основной структурой $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{-Гли}$, где $n=2-11$ (обычно не более 6). Наличие тиоловых (SH) групп позволяет фитохелатинам связываться с ионами тяжелых металлов и образовывать в цитозоле хелатные комплексы с молекулярным весом 2,5–3,6 кДа. Фитохелатины, в отличие от металлотионеинов, не являются первичными генными продуктами, а синтезируются из глутатиона при участии фермента фитохелатинсинтазы (γ -глутамилцистеинтранспептидазы). Регуляция синтеза фитохелатинов осуществляется на уровне экспрессии генов, кодирующих фитохелатинсинтазу, а также генов, кодирующих ферменты синтеза глутатиона. Впервые ген *CAD1*, кодирующий фитохелатинсинтазу, был выделен у *cad1*-мутантов арабидопсиса, способных синтезировать нормальное количество глутатиона, но низкое – фитохелатинов. В последние годы активно исследуется экспрессия генов *PCS*, кодирующих фитохелатинсинтазу у разных видов растений, в том числе арабидопсиса, риса, пшеницы, горчицы. В частности, у *Avicennia germinans* экспрессия гена *AgPCS* активировалась под влиянием не только кадмия, но и меди. Уровень экспрессии гена *SmPCS* у гипераккумулятора свинца *Salvinia minima* при действии этого металла возрастал в листьях, в то время как в корнях, наоборот, снижался. Несмотря на то, что роль фитохелатинов в механизмах детоксикации тяжелых металлов доказана, участие фитохелатинсинтазы и самих фитохелатинов в механизмах устойчивости к тяжелым металлам изучено недостаточно полно. Например, известно, что сверхэкспрессия гена *AtPCS1* и повышенный уровень фитохелатинов у трансгенных растений арабидопсиса может усиливать аккумуляцию кадмия без увеличения устойчивости растений, более того, даже приводит к их гиперчувствительности к кадмию. Отметим, что экспрессия гена пшеницы *TaPCS1* приводила к

снижению чувствительности мутантов *cad1-3* (неспособными синтезировать фитохелатины) арабидопсиса к кадмию и кроме того способствовала дальнейшему транспорту кадмия, что, в свою очередь, приводило к снижению его накопления в корнях. В экспериментах с мутантами *A. thaliana cad2-1* (со сниженным синтезом глутатиона) и *cad3-1*, было показано, что оба мутанта обладают высокой степенью аккумуляции мышьяка в побегах растений.

2.5. Экспрессия генов ферментов метаболизма глутатиона

Глутатион представляет собой трипептид, состоящий из остатков трех аминокислот: цистеина, глицина и глутамина (γ -глутамилцистеинилглицин). Глутатион содержит тиоловые группы, посредством которых он способен связываться с ионами металлов и металлоидов. Глутатион обнаружен у всех организмов, включая растения.

Синтез глутатиона осуществляется в два этапа. Первый этап включает образование γ -глутамилцистеина из глутамата и цистеина. Данный этап катализируется ферментом γ -глутамилцистеинсинтетазой. Второй этап заключается в конъюгации γ -глутамилцистеина с глицином и катализируется ферментом глутатионсинтетазой.

Установлено, что экспрессия генов, кодирующих ферменты, участвующие в биосинтезе глутатиона, способствует повышению металлоустойчивости растений. Показано, что не только кадмий, но и свинец способствует повышению экспрессии гена *SmGS*, активации глутатионсинтетазы и аккумуляции глутатиона как в листьях, так и в корнях растения гипераккумулятора *Salvinia minima*, при этом экспрессия гена *SmGS* в листьях была выше, чем в корнях.

Наряду с ферментами биосинтеза глутатиона, важным ферментом его метаболизма является глутатион-S-трансфераза, катализирующая конъюгацию глутатиона с алифатическими, ароматическими, эпоксидными и гетероциклическими радикалами различных ксенобиотиков, действующих на растения. Суперсемейство глутатион-S-трансферазы подразделяется на 7 классов (F, U, L, Z, T, DHAR, TCHQD), из которых характерными для растений являются F и U классы. Известно, что у арабидопсиса семейство генов *gst* кодирует глутатион-S-трансферазу U класса, представителями данного семейства у риса являются гены *osgtu3* и *osgtu4*. Показано, что цинк индуцирует экспрессию *osgtu3* и *osgtu4* генов в корнях проростков риса уже через несколько часов от начала воздействия.

Другим глутатионзависимым ферментом является метилтрансфераза, катализирующая обратимые реакции переноса метильных групп. Прямых доказательств участия метилтрансферазы в защитных механизмах растений на действие тяжелых металлов к настоящему моменту нет. Однако показано, что сверхэкспрессия генов *SMTAt* и *SMTBj*, выделенных из гипераккумулятора селена *Astragalus bisulcatus*, способствовала повышению устойчивости к селену у *A. thaliana* и *Indian mustard*. Кроме того, эти трансгенные растения отличались большей способностью аккумулировать селен, чем растения дикого типа.

2.6. Экспрессия генов белков – участников неспецифических стрессорных реакций

Наряду с активацией генов и синтеза белков, участвующих непосредственно в передаче стресс-сигнала, транспорте ионов и механизмах детоксикации, тяжелые металлы оказывают влияние и на экспрессию генов и, соответственно, синтез белков, участвующих в неспецифических механизмах адаптации к действию различных стресс-факторов.

В частности, тяжелые металлы и металлоиды способны активировать экспрессию генов семейства *Hsp* белков теплового шока (БТШ), являющихся важными компонентами клеточного ответа практически на любое стрессовое воздействие. Например, у проростков томата при воздействии мышьяка происходило увеличение содержания транскриптов гена *Hsp90-1* в корнях, а под влиянием хрома – преимущественно в побегах. Воздействие кадмия на растения риса также способствовало активации экспрессии генов БТШ.

Кроме того, показано, что у растений *Lupinus luteus* при действии свинца, кадмия, а также мышьяка происходит активация экспрессии гена *LIPR10*, относящегося к семейству генов *PR* (pathogenesis-related protein). Как известно, экспрессия генов *PR* семейства активируется не только при биотическом стрессе, но и под влиянием тяжелых металлов, а также при других абиотических стрессах, поэтому предполагается их участие в защитных реакциях растений на действие широкого спектра стресс-факторов.

ГЛАВА 3

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

3.1. Методы основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – один из основных методов молекулярной биологии. ПЦР используется для амплификации определенного фрагмента ДНК из сложной смеси исходного материала. Широкое применение данного метода обусловлено простотой реакции и относительной легкостью выполнения (Приложение 1).

Данный процесс происходит в 3 стадии:

- денатурация,
- отжиг,
- синтез (элонгация).

Каждая стадия повторяется 30–40 раз, тем самым образуя циклы ПЦР.

На первой стадии двухцепочечную матрицу ДНК денатурируют с помощью нагревания до 90 °С в результате чего внутри сложной ДНК становится доступной область, которая в последующем будет специфически амплифицирована. Затем температура понижается.

Стадия отжига заключается в гибридизации двух олигонуклеотидных праймеров, которые присутствуют в избытке, для связывания с комплиментарными участками, фланкирующими ДНК-мишень. Отожженные олигонуклеотиды действуют как праймеры для синтеза ДНК, поскольку они имеют свободную 3' гидроксильную группу для ДНК-полимеразы. Стадия синтеза завершается удлинением цепи.

Синтез ДНК происходит с обоих праймеров до тех пор, пока новая цепь не вытягивается вдоль амплифицируемой ДНК-мишени и за ее пределы. В процессе следующего цикла в качестве матрицы будет использоваться не только исходная цепь, но и новые цепи, таким образом происходит экспоненциальное увеличение количества продуцируемой ДНК.

На основании реакции ПЦР разработаны многие методы молекулярной биологии, выбор которых зависит от поставленных задач исследования, на решение которых они направлены. Далее будут рассмотрены наиболее часто используемые методы на основе ПЦР, применяемые для исследования экспрессии генов.

Особенность метода **ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РВ) или количественного ПЦР** в отличие от классической полимеразной цепной реакции заключается в том, что метод ПЦР в режиме реального времени позволяет осуществлять детекцию продуктов амплификации одновременно с количественным определением (измерение непосредственно количества копий) специфической последовательности ДНК в образце. Измерение количества амплифицированной ДНК в режиме реального времени производится после каждого цикла амплификации. Этот метод исключает стадию электрофореза, что способствует значительному сокращению продолжительности эксперимента.

Существуют различные подходы для регистрации продуктов амплификации в процессе ПЦР. К их числу относится метод "выщепление 5'-концевой метки" (Приложение 2). При использовании данной методики в реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, содержащие на 5'-конце флуоресцентную метку (флуорофор), а на 3'-конце – гаситель флуоресценции. ДНК-зонды комплиментарны участку амплификации. В ходе ПЦР на стадии отжига ДНК-зонды присоединяются к участку амплификации. В таком состоянии гаситель поглощает излучение, испускаемое флуоресцентной меткой. На стадии элонгации ДНК-полимераза, используя праймер в качестве затравки, начинает синтез комплиментарной цепи ДНК в направлении ДНК-зонда. При его достижении благодаря 5'-экзонуклеазной активности этот фермент выщепляет флуорофор. В результате происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что сопровождается свечением. Интенсивность свечения с каждым циклом ПЦР будет усиливаться. В то же время интенсивность свечения будет зависеть и от числа копий анализируемых ДНК в образце. Таким образом, по интенсивности свечения можно судить о количественном содержании анализируемой ДНК в исследуемых пробах.

Полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Выделенную РНК в реакции обратной транскрипции (ОТ) с помощью обратной транскриптазы синтезируют первую цепь кДНК, которая затем используется в традиционном методе ПЦР. В данном методе используются термостабильные ДНК-полимеразы, обладающие активностью обратной транскриптазы, что позволяет объединить реакции обратной транскрипции и ПЦР. Одним из преимуществ данного метода является возможность идентифицировать с большей чувствительностью редкие и представленные в небольших копиях транскрипты или низкий уровень мРНК (Приложение 3).

В основе **метода дифференциального дисплея** также лежит традиционный метод ПЦР с использованием обратной транскриптазы. Применяется для анализа экспрессии дифференциально экспрессирующихся и тканеспецифичных генов. Выделенная РНК должна быть переведена в кДНК в процессе обратной транскрипции, которая затем используется в реакции ПЦР. Отличие данного метода заключается в том, что при амплификации, в сочетании с произвольными праймерами используются праймеры, способные гибридизироваться с основными элементами мРНК, такими как poly(A)-хвост. В результате происходит воспроизводимый синтез множества продуктов ПЦР, сравнительный анализ которых с помощью электрофореза в геле позволяет обнаружить и выделить по-разному экспрессируемые транскрипты. Результаты, полученные данным методом, позволяют сравнить профили транскриптов разных образцов, даже при отсутствии информации о нуклеотидной последовательности того или иного организма (Приложение 4).

3.2. Методы модулирования экспрессии гена с помощью РНКи

Наряду с методами определения экспрессии генов в настоящее время используются методы модулирования экспрессии, что позволяет контролировать данный процесс в условиях конкретного эксперимента. Как правило, методы используемые для регуляции экспрессии генов, основываются на изменении уровня экспрессии мРНК посредством манипуляций с последовательностями промотора или уровнем синтеза вспомогательных белков. Однако наряду с широко используемыми методами в последнее

время применяется метод, в основе которого лежит процесс интерференции РНК (РНКи).

Метод с использованием анти-смысловой РНК. В ходе данного метода в клетку вводится последовательность нуклеиновой кислоты комплиментарную экспрессируемой мРНК. Эта анти-смысловая последовательность связывается с мРНК и предотвращает ее транскрипцию, данный процесс называется интерференцией РНК.

Метод с использованием малых интерферирующих РНК (миРНК). Наряду с использованием анти-смысловых РНК, для исследования экспрессии генов широко используются миРНК – короткие двухцепочечные РНК длиной не более 30 нуклеотидов. При введении в клетку миРНК способны вызывать эффект молчания генов и приводить к ингибированию транскрипции.

3.3. Методы идентификации и анализа мРНК

Метод Нозерн-блот. Впервые данный метод был предложен в 1977 г. Джеймсом Олвайном с соавт. Данный метод предполагает исследование экспрессии генов путем тестирования молекул РНК (мРНК) и их фрагментов в образцах. Отличием данного метода от сходного метода Саузерн-блота является то, что определяемым субстратом является РНК, а не ДНК.

Общий принцип метода заключается в разделении относительно их размеров выделенной из образца мРНК методом электрофореза. После этого РНК фиксируется на мембране воздействием УФ или при «обжиге» 80 °С в вакууме. На мембрану также помещаются флуоресцентные метки, которые гибридизируясь с матрицей (мРНК) вызывают свечение, которое в последующем детектируется и визуализируется на рентгеновской пленке. Такой вид переноса РНК из геля на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану называется непрямым. Это позволяет идентифицировать последовательность определенной длины с помощью гибридизации меченого ДНК-зонда. С помощью этого метода можно не только детектировать специфические молекулы РНК, но также определить относительное количество специфической мРНК.

Метод «Слот-» или «дот-блотинг». В отличие от Нозерн-блотинга, в котором используется не прямой способ переноса нук-

леиновых кислот на мембранные фильтры после их фракционирования в агарозном геле, в данном методе используется прямой способ переноса пробы в специальный аппарат, содержащий нейлоновую мембрану. Данный метод дает возможность оценивать относительное содержание специфических транскриптов мРНК без необходимости проведения гель-электрофореза, но не дает информации относительно размеров исследуемых фрагментов.

Метод защиты от РНКаз. Наряду с Нозерн блоттингом для идентификации и анализа мРНК в настоящее время широко используется метод с применением нуклеаз. В основе данного метода лежит гибридизация в растворе одноцепочечной мРНК с избытком меченого однострессового РНК-зонда. Гибридизованная часть комплекса становится защищенной, тогда как негибридизованная часть зонда расщепляется РНКазойА и РНКазойТ. Гибридизованный фрагмент затем анализируется в полиакриламидном геле с высоким разрешением. Данный метод позволяет получить информацию не только относительно структуры транскрипта мРНК, а также и о количественном ее содержании (Приложение 5).

3.4. Метод с использованием ДНК-микрочипов

Использование данного метода позволяет одновременно осуществлять широкомасштабный анализ и количественное определение генов и их экспрессии. Микрочип представляет собой упорядоченное расположение тысяч последовательностей ДНК, таких как олигонуклеотиды или кДНК. ДНК образца инкубируют с чипом и затем отмывают всю негибридизованную ДНК, затем чип анализируют и определяют характер гибридизации, регистрируя флуоресценцию. Микрочиповая технология имеет широкое применение в разных молекулярных методах, однако стоит отметить, что для изготовления микрочипа требуется высокая степень очистки ДНК. Отчасти данная проблема решается внедрением автоматической очистки ДНК.

3.5. Использование методов ПЦР для изучения влияния тяжелых металлов на экспрессию генов у растений

В данной главе описываются примеры использования методов ПЦР для исследования экспрессии генов у растений в условиях действия тяжелых металлов.

Использование ПЦР РВ для изучения экспрессии гена фитохелатинсинтазы у проростков пшеницы, подвергнутых воздействию сульфата кадмия (100 мкМ) в течение 7 дней. Проведение эксперимента с использованием ПЦР метода, включает следующие этапы:

1. Фиксация материала

50 мг растительного образца замораживают в жидком азоте и хранят до непосредственной процедуры выделения тотальной РНК (тРНК) при температуре -70°C .

2. Пробоподготовка

– Для выделения тРНК растительную ткань растирают в жидком азоте с использованием набора РНК-Экстран («Синтол», Россия), следуя протоколу выделения фирмы-изготовителя, который прилагается к набору.

– Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывают ДНКазой (10 ед./мл) («Синтол», Россия).

– Проверка чистоты и концентрации тРНК определяется с использованием спектрофотометрического метода при длине волны 260 нм (A260). A260 равное 1 соответствует 40 мкг тРНК. Для определения концентрации в полученном образце берут часть образца, разводят до необходимого для измерения в кювете объема, измеряют A260 и рассчитывают концентрацию образца по следующей формуле:

$$[\text{образец}] \text{ мкг/мл тРНК} = A260 \times [\text{фактор разведения}] \times 40 \text{ мкг/мл}$$

– Полученную смесь РНК используют в качестве матрицы для синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) с помощью обратной транскрипции (ОТ). Для проведения реакции ОТ используются готовые наборы реактивов («Синтол», Россия). Протокол проведения реакции прилагается к набору. Полученная кДНК может сразу использоваться для проведения ПЦР и хранится при температуре -20°C . Длительное хранение образцов возможно при температуре -70°C .

3. Дизайн праймеров

При проведении ПЦР РВ используют два праймера (front (F) – прямой и reverse (R) – обратный), которые по принципу комплементарности взаимодействуют с противоположными цепями ДНК и ограничивают амплифицируемый участок мРНК. Дизайн праймеров проводится с использованием программы Primer3

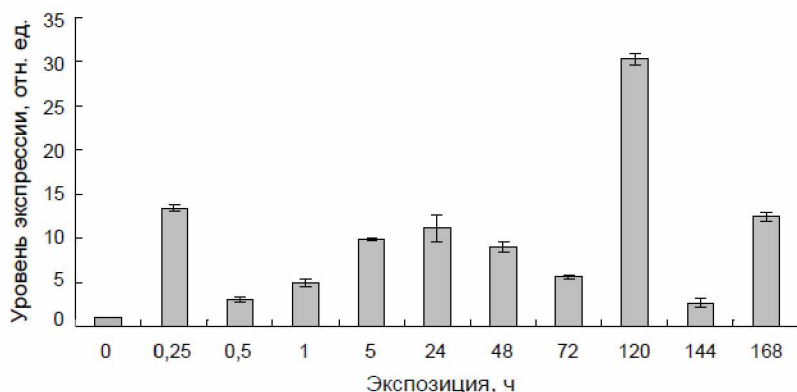
(<http://primer3.wi.mit.edu/>) или на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

При заказе праймеров в компаниях «Литех» (<http://www.lytech.ru>), «Синтол» (<http://www.syntol.ru>), «Евроген» (<http://www.evrogen.ru>) и др., указывается название и их последовательность. Например, нуклеотидная последовательность праймеров для исследования гена *PCSI*, кодирующего фермент фитохелатинсинтазу выглядит следующим образом: F: 5'-CCT CGC CTC CCT CTC CGT CGT GC-3', R: 5'-AGT CGT GGA TGG TGG TCT GGT CG-3'

Для проведения полимеразной цепной реакции готовят реакционную смесь содержащую кДНК, смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), ПЦР-буфер, MgCl₂, ДНК-полимеразу, прямой и обратный праймер, свободную от нуклеаз воду. Рекомендуемое количество всех компонентов фирмой изготовителем прилагается к специальному набору (например, набор М-427 «2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с Tag ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами в присутствии красителя SYBR Green I», «Синтол», Россия). Однако в зависимости от условий проведения реакции и методических рекомендаций для каждого конкретного случая, количество используемых реактивов может изменяться. Для детекции продуктов ПЦР в реакционной смеси используют интеркалирующий краситель SYBR Green. Полученная смесь раскапывается в специальные пробирки – стрипы, которые помещаются в специальные детектирующие амплификаторы или термоциклеры («Bio Rad», «АхуGene» и др.).

Используемые специализируемые детектирующие амплификаторы или термоциклеры сопровождаются программным обеспечением, которое устанавливается на рабочий компьютер (например, программа «Bio-Rad iQ5 Optical System Software» для амплификатора фирмы Bio-Rad с оптической приставкой iQ5). Протокол амплификации подбирают в зависимости от характеристик используемых праймеров на основании результатов градиентного анализа. Помимо основных экспериментальных проб обязательно наличие положительных (с добавлением ДНК-матрицы) и отрицательных (без добавления ДНК-матрицы) контрольных проб. Для проверки специфичности амплификации после завершения процедуры амплификации проводят плавление синтезированных ампликонов.

Представление результатов. Полученные результаты можно представить в виде рисунка.



Экспрессия гена *PCS1* в листьях проростков пшеницы при действии кадмия.
Уровень экспрессии генов у контрольных растений (без кадмия)
принят за единицу

Данный рисунок иллюстрирует зависимость уровня экспрессии гена *PCS1* от продолжительности воздействия кадмия (100 мкМ). Полученные результаты свидетельствуют о том, что при воздействии кадмия содержание транскриптов гена *PCS1* в листьях пшеницы увеличивается уже через 15 мин. от начала воздействия и сохраняется на повышенном уровне в течение всего эксперимента.

Наряду с использованием методов ПЦР для изучения влияния тяжелых металлов на экспрессию генов у растений в настоящее время в молекулярной биологии применяются методы с использованием ДНК-микрочипов.

ДНК-микрочип (англ. DNA microarray) представляет собой упорядоченное расположение тысяч ДНК последовательностей, таких как кДНК или олигонуклеотиды, закрепленных на твердой (стеклянной или кремниевой) подложке. На микрочипы могут быть нанесены самые разные варианты нуклеиновых кислот, это могут быть мРНК или кодирующие и регуляторные области определенного гена или группы генов. Гибридизация образцов и мишени регистрируется и количественно характеризуется при помощи флуоресценции или хемилюминесценции, что позволяет опреде-

лить относительное количество нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью в образце (Приложение 6).

После завершения анализа экспрессии генов на микрочипах и количественной обработки результатов, данные можно представить в виде таблицы. В данном случае представлена только часть таблицы результатов, полученных при исследовании экспрессии генов риса в корнях растений при воздействии кадмия.

Экспрессия генов в корнях риса при воздействии кадмия (Ogawa et al., 2009)

	Gene location	RAP-DB description	Fold Change
1	Os01g0373700	Conserved hypothetical protein	62.68
2	Os03g0180900 ^a	ZIM domain containing protein	52.15
3	Os01g0699600 ^a	Protein kinase-like domain containing protein	44.16
4	Os03g0820300 ^a	Similar to ZPT2-14	43.27
5	Os01g0389700	Protein of unknown function DUF679 family protein	40.16
6	Os10g0517500 ^a	Cys/Met metabolism pyridoxal-phosphate-dependent enzymes family protein	37.59
7	Os01g0373800	Conserved hypothetical protein	35.63
8	Os01g0609300 ^a	OsPDR9	34.85
9	Os11g0151400 ^a	Cytochrome P450 family protein	32.61
10	Os07g0529000 ^a	Similar to Isocitrate lyase (Fragment)	30.12
11	Os10g0392400 ^a	ZIM domain containing protein	28.78
12	Os01g0661800	Conserved hypothetical protein	28.72
13	Os09g0243200	Zinc finger, RING-type domain containing protein	28.59
14	Os03g0437200 ^a	Zinc finger, C2H2-type domain containing protein	27.96
15	Os03g0760200 ^a	Cytochrome P450 family protein	27.73

Рекомендуемая литература

Баишмаков Д.И., Лукаткин А.С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений. Саранск: Изд-во Мордовского университета, 2009. 236 с.

Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 440 с.

Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных растений. М.: Дрофа, 2010. 638 с.

Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: Учебник. М.: Высшая школа, 2011. 784 с.

Молекулярно-генетические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 487 с.

Патрушев Л. И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000, 830 с.

Практикум по молекулярной биологии / А.С. Коничев, И.Л. Цветков, А.П. Попов и др. – М.: КолоС, 2012. 151 с.

Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / Под ред. К.Уилсон, Дж. Уолкер ; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 848 с.

ПЦР «в реальном времени» 2-е издание исправленное / Под ред. Д. В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с.

Резяпкин В.И. Прикладная молекулярная биология: пособие. Гродно: ГрГУ им Я. Купалы, 2011. 167 с.

Серегин И. В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Успехи биол. химии. 2001. С. 283–300.

Серегин И.В., Кожеевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 2. С. 285–308.

Ситиков А.С. Антисмысловые РНК как посланники в межклеточной коммуникации: 20 лет спустя // Успехи биологической химии. 2012. Т. 52. С. 157–176.

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Устойчивость растений к кадмию (на примере семейства Злаков): учебное пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. 55 с.

Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учебное пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 77 с.

Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с.

Физиология растений: Учебник для студ. вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко и др. Под ред. И.П. Ермакова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 640 с.

Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 240 с.

Capdevila M., Bofill R., Palacios O., Atrian S. State-of-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century // *Coordin. Chem. Rev.* 2012. Vol. 256. P. 46–62.

DalCorso G., Farinati S., Furini A. Regulatory networks of cadmium stress plants // *Plant Signal. Behav.* 2010. Vol. 5, N 6. P. 663–667.

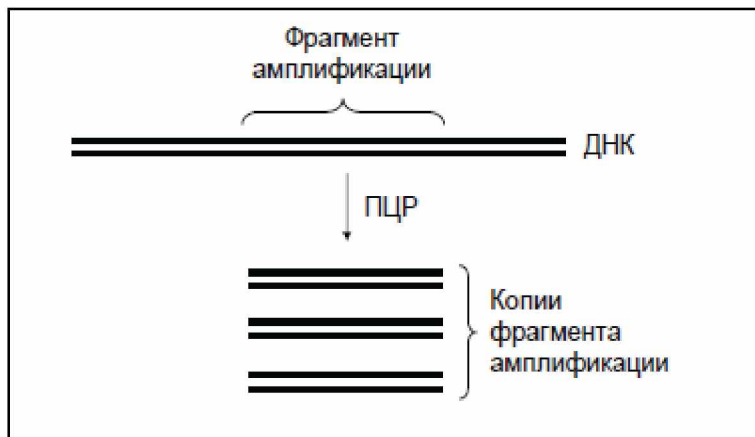
Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. Vol. 9. P. 436–442.

Gallego S. M., Pena L. B., Barcia R. A., Azpilicueta C. E., Iannone M. F., Rosales E. P., Zawoznik M. S., Groppa M. D., Benavides M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms // *Environ. Exp. Bot.* 2012. Vol. 83. P. 33–46.

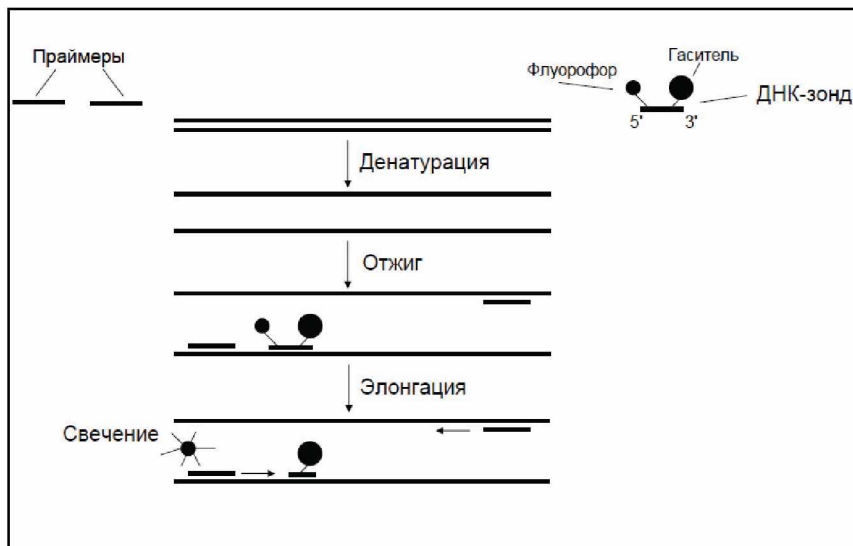
Ogawa I., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N. K. Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice // *Plant Soil.* 2009. Vol. 325. P. 97–108.

Pal R., Rai J. P. N. Phytochelatins: Peptides involved in heavy metal detoxification // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. Vol. 160. P. 945–963.

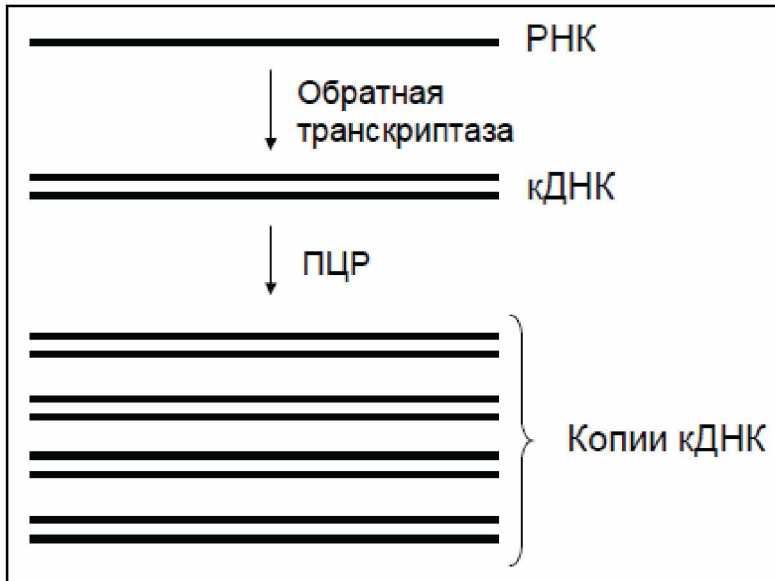
Prévéral S., Gayet L., Moldes C., Hoffmann J., Mounicou S., Gruet A., Reynaud F., Lobinski R., Verbavatz J.-M., Vavasasseur A., Forestier C. A common highly conserved cadmium detoxification mechanisms from Bacteria to humans // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. N 8. P. 4936–4943.



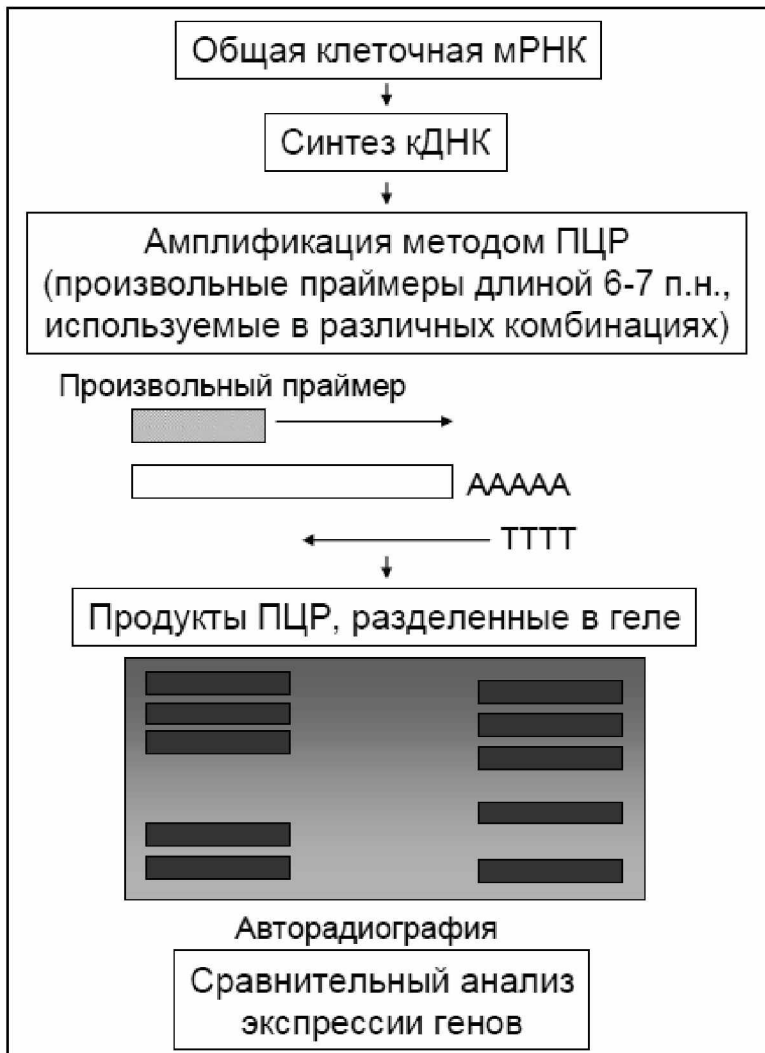
Общий принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)
(по: Резяпкин, 2011)



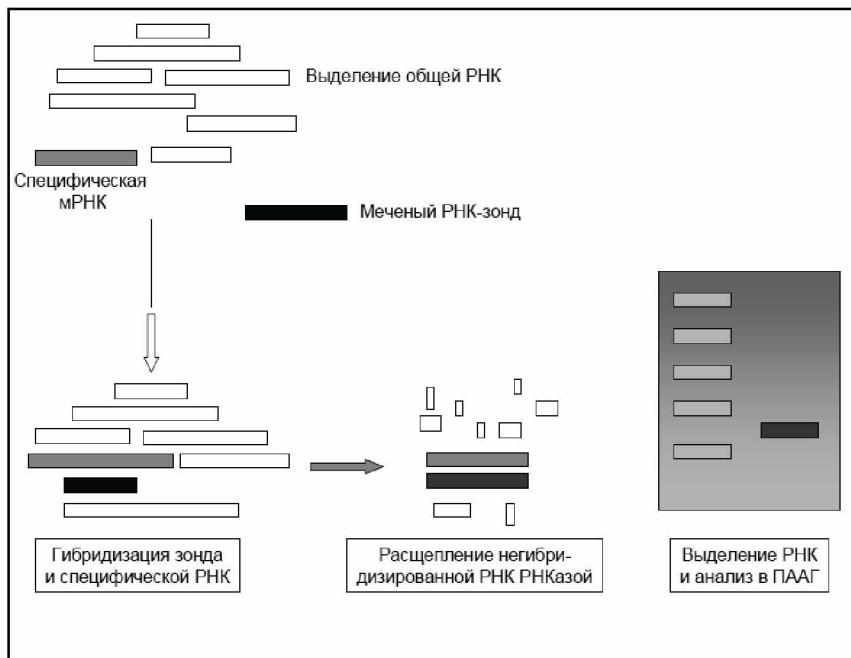
Регистрация продуктов амплификации в процессе ПЦР в реальном времени при использовании методики «Выщепление 5'-концевой метки» (по: Резяпкин, 2011)



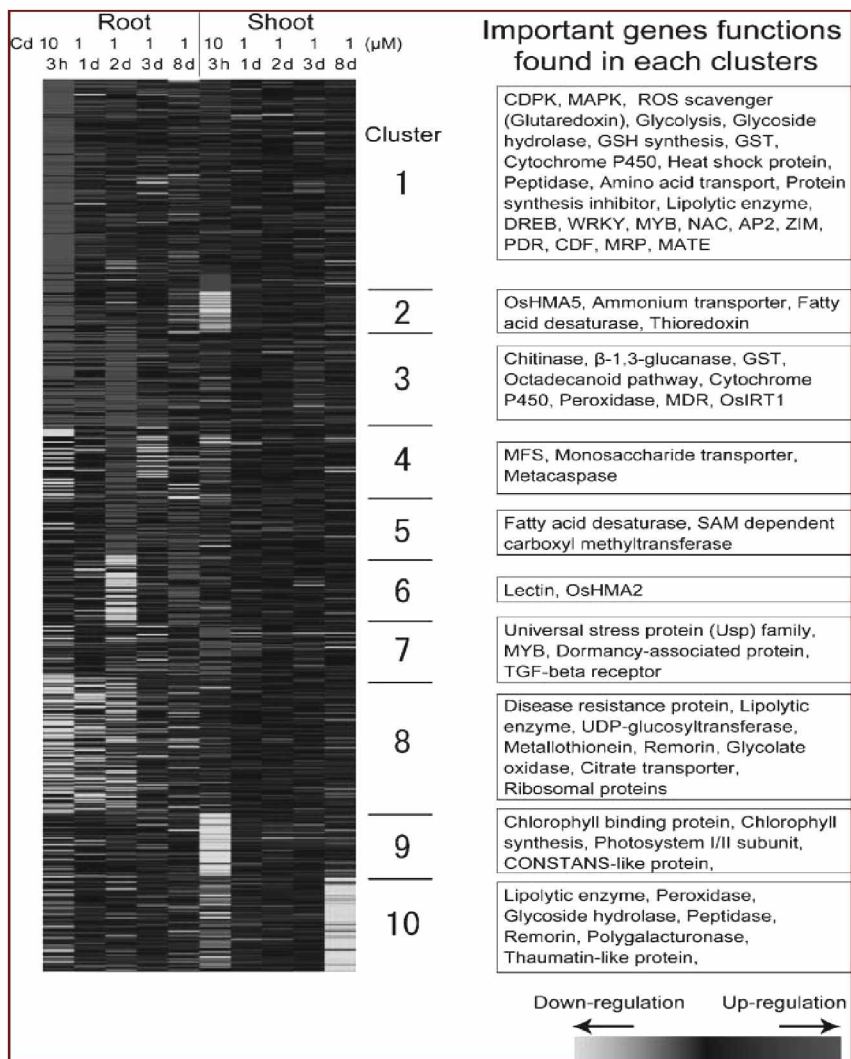
Общий принцип метода полимеразной цепной реакции совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (по: Резяпкин, 2011)



Анализ экспрессии гена методом дифференциального дисплея
(по: Уилсон, Уолкер, 2013)



Общая схема метода защиты действия от РНКаз
(по: Уилсон, Уолкер, 2013)



Кластерный анализ экспрессии 3,596 генов в стебле и корнях риса при воздействии кадмия (Ogawa et al., 2009)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Влияние тяжелых металлов на растения	4
Глава 2. Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов у растений	6
2.1. Экспрессия генов транскрипционных факторов	6
2.2. Экспрессия генов белков-транспортёров	7
2.3. Экспрессия генов металлотионеинов	10
2.4. Экспрессия генов фитохелатинсинтазы	11
2.5. Экспрессия генов ферментов метаболизма глутатиона	12
2.6. Экспрессия генов белков – участников неспецифических стрессорных реакций	13
Глава 3. Методы изучения экспрессии генов	14
3.1. Методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР)	14
3.2. Методы модулирования экспрессии гена с помощью РНКи . . .	16
3.3. Методы идентификации и анализа мРНК	
3.4. Метод на основе ДНК микрочипов	18
3.5. Использование методов ПЦР для изучения влияния тяжелых металлов на экспрессию генов у растений	18
Рекомендуемая литература	23
Приложение	25

Н.С. Репкина, В.В. Таланова, Л.В. Топчиева

**УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ
И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ**

Учебно-методическое пособие

*Печатается по решению Ученого совета
Института биологии
Карельского научного центра РАН*

Сдано в печать 03.10.2013 г. Формат 60х84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,1. Усл. печ. л. 1,86. Тираж 100 экз.
Изд. № 408. Заказ № 159

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50